

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-047474

(43)Date of publication of application : 18.02.2003

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C12Q 1/68
G01N 33/53
G01N 33/566

(21)Application number : 2001-235806

(71)Applicant : NICHIREI CORP

(22)Date of filing : 03.08.2001

(72)Inventor : KOIZUMI YUSHI
YAMAMOTO SATOSHI
ITO TAKESHI
NAKAGAWA HIROSHI

(54) METHOD FOR DETECTION, IDENTIFICATION AND COUNTING OF VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS USING GENE (RPOD) SEQUENCE ENCODING RNA POLYMERASE SIGMA70 FACTOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To produce a specific gene amplification primer having high performance and useful for the detection, determination and identification of *Vibrio parahaemolyticus*, having low risk of misjudgment and exhibiting practically sufficient amplification efficiency and amplification specificity.

SOLUTION: The base sequences of an RNA polymerase $\sigma 70$ factor *rpoD* gene of a standard strain of the genus *Vibrio* and a stock strain of *Vibrio parahaemolyticus* (a strain having toxin gene and a strain free from toxin gene) are determined, the system relationship of the strains is clarified and a characteristic base of *Vibrio parahaemolyticus* is identified to enable the design of a probe having high specificity and containing the base and a primer for the amplification of gene in high amplification efficiency and high specificity.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 10.12.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-47474

(P2003-47474A)

(43) 公開日 平成15年2月18日 (2003.2.18)

(51) IntCl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	M 4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/53			S
		33/566	
33/566		C 1 2 N 15/00	Z N A A
		審査請求 未請求 請求項の数18	O L (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2001-235806 (P2001-235806)

(22) 出願日 平成13年8月3日 (2001.8.3)

(71) 出願人 000134970

株式会社ニチレイ

東京都中央区築地6丁目19番20号

(72) 発明者 小泉 雄史

千葉県千葉市美浜区新港9番地 株式会社
ニチレイ技術開発センター内

(72) 発明者 山本 敏

千葉県千葉市美浜区新港9番地 株式会社
ニチレイ技術開発センター内

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 RNAポリメラーゼ σ 70因子をコードする遺伝子 (rpoD) 配列を用いた腸炎ビブリオ検出、
同定、計数方法

(57) 【要約】

【課題】 誤判定の可能性が低く、かつ実用上十分な増幅効率と増幅特異性を有する、高性能な腸炎ビブリオの検出・定量・同定用特異遺伝子増幅プライマーの作製すること。

【解決手段】 本発明者等は、ビブリオ属標準菌株及び腸炎ビブリオ保存株 (毒素遺伝子保有株及び非保有株) のRNAポリメラーゼ σ 70因子rpoD遺伝子塩基配列を決め、その系統関係を明らかにし、腸炎ビブリオに特徴的塩基を同定し、これを含む高特異性を有するプローブ、及び高特異性を有しかつ増幅効率に優れた遺伝子増幅用プライマーを設計することを可能とした。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表中の配列番号1のRNAポリメラーゼσ70因子をコードする遺伝子(rpoD)中で、腸炎ビブリオ菌群に特有な次の位置番号33, 93, 102, 123, 141, 147, 148, 192, 198, 204, 223, 229, 234, 243, 259, 261, 264, 267, 270, 384, 390, 501, 594, 597, 633, 712, 735, 又は798のいずれかの塩基を含む、特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号1で表される遺伝子の断片。

【請求項2】 配列表中の配列番号1のRNAポリメラーゼσ70因子をコードする遺伝子(rpoD)中で、腸炎ビブリオ菌群に特有な次の位置番号33, 93, 102, 123, 141, 147, 148, 192, 198, 204, 223, 229, 234, 243, 259, 261, 264, 267, 270, 384, 390, 501, 594, 597, 633, 712, 735, 又は798のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上からなる腸炎ビブリオ検出、定量又は同定用遺伝子増幅プライマー。

【請求項3】 請求項2で指定された腸炎ビブリオに特有な位置を高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項2記載の腸炎ビブリオ検出、定量又は同定用遺伝子増幅プライマー。

【請求項4】 配列表中の配列番号1の位置番号259, 261, 264, 267, 270の位置の塩基を含む請求項3記載の腸炎ビブリオ検出、定量又は同定用遺伝子増幅プライマー。

【請求項5】 配列表中の配列番号1の位置番号141, 147, 148の位置の塩基を含む請求項3記載の腸炎ビブリオ検出、定量又は同定用遺伝子増幅プライマー。

【請求項6】 配列表中の配列番号1の位置番号192, 198, 204の位置の塩基を含む請求項3記載の腸炎ビブリオ検出、定量又は同定用遺伝子増幅プライマー。

【請求項7】 配列表中の配列番号1の位置番号223, 229, 234の位置の塩基を含む請求項3記載の腸炎ビブリオ検出、定量又は同定用遺伝子増幅プライマー。

【請求項8】 配列表中の配列番号1の位置番号594, 597の位置の塩基を含む請求項3記載の腸炎ビブリオ検出、定量又は同定用遺伝子増幅プライマー。

【請求項9】 3'末端の塩基が該腸炎ビブリオに特有な請求項2で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項2記載の腸炎ビブリオ検出、定量又は同定用遺伝子増幅プライマー。

【請求項10】 5'-agarccttcgtctgactgatt-3'及び対応する相補鎖からなる腸炎ビブリオ検出、定量又は同定用プライマー。

【請求項11】 5'-aagaagacctagaagatgat-3'及び対応する相補鎖からなる腸炎ビブリオ検出、定量又は同定用プライマー。

【請求項12】 5'-cagcwgccgccaaccgcgact-3'及び対応する相補鎖からなる腸炎ビブリオ検出、定量又は同定用プライマー。

【請求項13】 5'-ctgarctgtctgaarctcaa-3'及び対応する相補鎖からなる腸炎ビブリオ検出、定量又は同定用

プライマー。

【請求項14】 5'-gttaccagtgaataggca-3'及び対応する相補鎖からなる腸炎ビブリオ検出、定量又は同定用プライマー。

【請求項15】 5'-attcgttaccagtgaatagg-3'及び対応する相補鎖からなる腸炎ビブリオ検出、定量又は同定用プライマー。

【請求項16】 請求項2-15のいずれか1項に記載のプライマーを用いる腸炎ビブリオを検出、定量又は同定する方法。

【請求項17】 請求項2-16のいずれか1項に記載のプライマーを含む、腸炎ビブリオの検出、定量又は同定用のキット。

【請求項18】 配列表中の配列番号1のRNAポリメラーゼσ70因子をコードする遺伝子(rpoD)中で、腸炎ビブリオ菌群に特有な次の位置番号33, 93, 102, 123, 141, 147, 148, 192, 198, 204, 223, 229, 234, 243, 259, 261, 264, 267, 270, 384, 390, 501, 594, 597, 633, 712, 735, 又は798のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上を含む腸炎ビブリオの検出、定量又は同定用プローブ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、遺伝子による微生物、病原菌の同定・検査の分野、特に腸炎ビブリオの検査の分野に係るものである。本発明は、夏季に食中毒の原因となる腸炎ビブリオ菌を、迅速に同定、検査する方法に係るもので、食品加工分野、公衆衛生分野、及び臨床検査分野等に属するものである。

【0002】

【従来の技術】現在、食品衛生の現場では、生化学的な表現形質により腸炎ビブリオの検査を行っている。食品衛生検査指針では、被検査試料をTCBS寒天培地に接種・培養し、形成された白糖非分解性の緑黄色の推定陽性コロニーを得、この緑黄色コロニーに対して種々の生化学的性状確認試験を行い、判定することとなっている。しかし、この生化学的性状の確認試験は熟練した技術と多大な労力と時間を必要とするため、食品製造管理の現場で実施するには多くの問題が存在する。この従来からの生化学的性状試験の欠点を補うために、正確かつ迅速簡便な腸炎ビブリオの検出・同定を目的として、遺伝子による検査方法の開発が試みられている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】現在までの遺伝子を用いた腸炎ビブリオの検査方法として、以下のような方法が開発されているが、種々の問題がある。例えば、DNAジャイレースβサブユニットをコードするgyrB遺伝子をターゲットとした腸炎ビブリオ検出用PCRプライマーが開発されている(特開平09-252783号、Applied and Environmental Microbiology, Vol. 64, No. 2, P. 681-687)。しかしながら、本プライマーは、腸炎ビブリオATCC17802

株とビブリオアルジノリチカスATCC17749株それぞれ1菌株のみのgyrB遺伝子配列を解析し、両者で配列が異なる部分を特異的であると推測して作製した物である。従って、gyrB遺伝子配列に基づいたビブリオ属の系統関係を把握した上で作製されたものではないために、特異性の範囲が明らかでない。さらに、コレラ菌毒素遺伝子を制御する遺伝子として見いだされ、腸炎ビブリオにも存在することが知られているtoxR遺伝子をターゲットとした、PCR法による検出方法も報告されている(Journal of Clinical Microbiology. 1999 Vol. 37 No. 4, p. 1173-1177)。しかしながら、当該例のPCRプライマーも先のgyrB遺伝子を用いた検出プライマーと同様に、腸炎ビブリオとコレラ菌という比較的隔たった系統間の、それぞれ1菌株の遺伝子配列を比較して、2者間で異なる塩基配列部分を腸炎ビブリオ特異的配列として推測したものである。従って、当該プライマーも、やはり、toxR遺伝子配列に基づいた系統関係を把握した上で作製されたものではないため、特異性の範囲が明らかでない。一方、腸炎ビブリオが有する毒素の遺伝子に注目した検出法も存在する(特開平4-293486)。腸炎ビブリオには、赤血球の膜に穴をあけて溶血させる(神奈川現象と呼ばれる)毒素(耐熱性溶血毒:Thermostable direct haemolysin:TDH)を有するタイプと有さないタイプがあることが古くから知られており、最近では、TDH以外にも、神奈川現象を起こさないが、下痢を発症させる、TDHとよく似たTRH(耐熱性溶血毒類似毒:TDH related haemolysin:TRH)という毒素があることも発見されている(1988年:Infect Immun. Vol. 56, 961-965)。これら腸炎ビブリオの病原性の原因とされる耐熱性毒素をコードしているそれぞれの遺伝子tdh及びtrhを特異的に検出するPCRプライマーが開発されている(特開平4-293486)。しかしながら、全ての腸炎ビブリオが毒素遺伝子を保有している訳ではない。実際、環境由来のほとんどの腸炎ビブリオは毒素遺伝子を保有していない。他方に、食品衛生の現場では毒素遺伝子を有さない株を含む全ての腸炎ビブリオ群の総菌数が重要であると考えられているため、食品衛生検査指針でも、腸炎ビブリオを毒素の有無に関わらず、検査することを求めている。したがって、毒素産生能にのみ注目した毒素遺伝子の検出は生化学検査に基づいた従来法と互換性がなく、食品衛生管理の現場における検出・同定方法としては適していない。このように、現在入手できる腸炎ビブリオの検出・同定用プライマーの実用性はいずれも十分なものではない。

【0004】これらの検出法の他にも、tlh(Thermolabile haemolysin: Lett Appl Microbiol 1999, Vol. 28, 66-70)、 σ -VPH(FEMS Microbiol Lett 1990;55(3):339-45)といった溶血因子や腸炎ビブリオに特異的に存在する0.76Kbの機能未知のDNA断片(Appl. Environ. Microbiol. 61(4):1311-1317)を検出する方法が報告されているが、いずれも腸炎ビブリオを確実に検出できるという証

明がなされておらず、検査現場では事実上使用できない。

【0005】上記のように従来の遺伝子検査方法は、いずれも、細菌の「種」が遺伝的な多様性を内包する集団であることを考慮しておらず、ある細菌集団のメンバーと推測される菌株の塩基配列がその集団共通又は代表する配列としてPCRのプライマーの設計に用いられている。しかしながら、分子進化特に中立的変異により速やかに蓄積する遺伝子変異を考えると、本来検出されるべき菌株がプライマー領域においてわずかに変異したために、プライマーとしての適性が減じ、増幅が阻害されて検出されないこともあり得る。また、系統的分析により近縁種との差異を考慮していないため、十分な特異性を持ったプライマーが設計できず、本来検出されるべきではない近縁株が検出されるといった誤判定の可能性が危惧される。

【0006】そこで、特異性のバックグラウンドが証明されており、誤判定の可能性が低く、かつ実用上十分な増幅効率と増幅特異性を有する、高性能な腸炎ビブリオの検出・同定・定量用特異遺伝子増幅プライマーの作製が必要とされていた。

【0007】

【課題を解決するための手段】細菌のある系統群の遺伝子を特異的に検出する方法を作成するためには、検出しようとする生物群、並びにその系統的に近縁な生物群の塩基配列をなるべく多数収集比較する必要がある。また、特異検出ターゲットとする遺伝子は、最も近縁の生物とも判別可能なように、十分に異なる塩基配列を有している必要がある。このためには、標的遺伝子は、十分早い進化速度を有していなくてはならない。

【0008】また、高頻度で水平伝播する遺伝子、例えば腸炎ビブリオの毒素遺伝子のように、系統とは無関係に存在する遺伝子を用いることができない。本発明でターゲットとして用いたrpoD遺伝子がコードする σ 70因子は、細菌の対数的増殖期の遺伝子発現を制御する因子であり、生存に必須の蛋白質である。この為水平伝播しがたく、また適切な進化速度を有しているため、細菌の系統解析に適している(Int. J. Syst. Bacteriol. 1998; 48, 813-819, Int. J. Syst. Bacteriol. 1999; 49, 87-95.)。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明者等は、既にRNAポリメラーゼ σ 70因子をコードするrpoD遺伝子のPCRダイレクトシークエンス法による簡便な塩基配列の決定方法を開発している(特開平8-256798号)。そこで、本発明者等は、当該方法を用いて、表1に示すビブリオ属標準菌株((財)発酵研究所より購入)及び腸炎ビブリオ保存株(毒素遺伝子保有株及び非保有株)のrpoD遺伝子塩基配列を決め、その系統関係を明らかにした。即ち、下記表1に示される供試菌株を2%NaCl添加ブレインハートインフ

ュージョン培地（日水製薬（株）製）で35℃・一晩増菌培養した菌液1mlよりPUREGENE DNA Isolation Kit (Gentra SYSTEMS)を用いて染色体DNAを抽出した。抽出したDNAを鋳型として、rpoD増幅ユニバーサルプライマー（特開平8-256798号に記載のs70S、s70R）を用いて約800bp（大腸菌K-12株のrpoD遺伝子配列上のポジション334-1125：アミノ酸配列ポジションでは、112から376に相当する領域）のrpoD遺伝子断片をPCR法により増幅した。増幅反応は、耐熱性DNAポリメラーゼ（AmpliTaQGold：Applied Biosystems製）を用い、GENE MATEサーマルサイクラー（ISC BioExpress）を使用して行った。反応液は1μg DNA、50mM KCl、10 mM Tris-HCl pH8.3、1.5 mM MgCl₂、0.01%ゼラチン、各0.2 mMのdNTP、2.5 UのAmpliTaQ Gold、プライマー各1μMを含む溶液を50μlに調製した。反応条件は、AmpliTaQ Goldの活性化（95℃・10分間）に続いて、94℃・1分間、56℃・1分間、72℃・1分間の反応を40サイクル行った後、72℃・10分間伸長反応を行った。得られたPCR産物は、1%アガロースゲル（Sea Plaque GTG agarose：BioWhittaker Molecular Applications製）で電気泳動（0.5xTAE、100V・30分間）の後、臭化エチジウムで10分間染色した。紫外線照射下でその存在を確認し、ゲルより切り出した後、Wizard PCR Preps DNA Purification System（Promega製）を用いて精製し、シーケンス反応の鋳型とした。シーケンス反応は、上記rpoD遺伝子用ユニバーサルプライマーに予め付加されているシーケンス用配列（特開平8-256798号に記載のs70sS、s70sR）をプライマーとしてABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit（Applied Biosystems製）を用い、GENE MATEサーマルサイクラー（ISC BioExpress）を使用して行った。反応液は、DNA20ng、プライマー3.2 pmol、BigDye Terminator Ready Reaction Mix8μlを混合し、最終体積20μlに調製した。サイクルシーケンス反応は、92℃・10分間の加熱後、96℃・10秒、58℃又は46℃（それぞれs70sS、s70sRに対応する）・5秒、60℃・4分を25サイクル行った。塩基配列の解析にはABI PRISM 310 GENETIC ANALYZER（Applied Biosystems製）を用いた。得られた塩基配列は、Clustal Wコンピュータプログラムを用いて多重アラインメント解析を行った後、PHYLPコンピュータプログラムパッケージを用い、木村の2パラメーターモデル（J. Mol. Evol. (1980) Vol. 16, No. 2, p. 111・20）で算出した遺伝的距離に基づいて近隣結合法（Mol. Biol. Evol. Vol. 4, No. 4, 406-425）により分子系統樹を作成した。

【0010】この結果、毒素遺伝子（tdh, trh）を有し、基準株（IFO 12711 T）を含む腸炎ビブリオと同定される全ての菌株は、ビブリオ属菌株中で独立した単系統をなすことが明らかとなった（図1参照）。即ち、この系統に属する細菌群が腸炎ビブリオと判定されるべきことが示唆された。次に、食品試料から分離したTCBS寒天培地（日水製薬（株）製）上で腸炎ビブリオ様の緑青色のコ

ロニーを形成する64株について、標準株と同様の手順にてrpoD遺伝子塩基配列を決定し、分子系統解析を実施した。この結果を図2に示した。解析した64株中11株が前述の腸炎ビブリオと判断されるべき系統に属していた。そこで、この遺伝子解析の結果を検証する為、生化学的性状の確認を食品検査指針に記載の1次及び2次確認テストに準じて検査を行った。即ち、1次確認テストとして、オキシダーゼ、TSI培地による乳・白糖分解能、ブドウ糖分解の際のガス発生能、硫化水素産生能、SIM培地によるインドール産生能、インドールピルビン酸産生能、運動性の確認、リシンデカルボキシラーゼ活性、Voges-Proskauerテスト、および耐塩性（0, 3, 7, 10%NaCl）について、更に2次確認テストとして、ONPG、オルニチンデカルボキシラーゼ活性、アルギニンデヒドラーゼ活性ならびに各種糖の発酵能（アラビノース、マルトース、イノシット、キシロース、サリシン、マンニット、マンノース、乳糖、白糖）の各項目について試験を行った。腸炎ビブリオは、1次確認テストについては、オキシダーゼ：陽性、TSI培地における乳・白糖：非分解、硫化水素：非産生、ブドウ糖分解の際のガス産生：無し、SIM培地におけるインドール産生能：陽性、インドールピルビン酸産生能：陰性、運動性：陽性、リシンデカルボキシラーゼ活性：陽性、Voges-Proskauerテスト：陰性、耐塩性（0, 3, 7, 10%NaCl）：-、+、+、-、の性状を示す。更に2次確認テストにおいては、ONPG：陰性、オルニチンデカルボキシラーゼ活性：陽性、アルギニンデヒドラーゼ活性：陰性、アラビノース：陽性、マルトース：陽性、イノシット：陰性、キシロース：陰性、サリシン：陰性、マンニット：陽性、マンノース：陽性、乳糖：陰性、白糖：陰性の性状を示す。以上の生化学検査の結果、先のrpoD遺伝子解析により腸炎ビブリオと判断されるべき系統に属した食品由来の11株のみが腸炎ビブリオであると判断された。これらのことから、rpoD遺伝子の解析によって、腸炎ビブリオ群を正確に判別・同定出来ることが示された。

【0011】そこで、腸炎ビブリオ群のみを検出可能な遺伝子検査法の確立の為、以下の作業を行った。まず、近縁種間の塩基配列の差異を明らかにするために、腸炎ビブリオが属する系統と近接する系統とのrpoD遺伝子の塩基配列を比較し、腸炎ビブリオ群内では保存され、他のビブリオ属細菌とは異なっている塩基の位置を同定した。具体的には、腸炎ビブリオが属する系統群のコンセンサス配列を求めるとともに、本系統と系統学的に近縁であることが図2により示された他のビブリオ属細菌系統であるC-1からC-3の系統のコンセンサス配列を比較し、系統特異的情報を作成した（図3）。この図3より、配列表中の配列番号1の33, 93, 102, 123, 141, 147, 148, 192, 198, 204, 223, 229, 234, 243, 259, 261, 264, 267, 270, 384, 390, 501, 594, 597, 633, 712, 735, 又は798の位置の塩基が本系統に特徴的であることが明らかとなった。これら特徴

的塩基を含む本系統に特異的な配列を用いることにより、高特異性を有するプローブ、及び高特異性を有しかつ増幅効率に優れた遺伝子増幅用プライマーを設計することが可能となる。

【0012】例えば、近縁種と塩基が相違する位置を必ず含むように、当該近縁種と相違する塩基を含む連続する15塩基以上のrpoD遺伝子の塩基配列、好適には、20塩基以上、更に好適には、20塩基以上で、40塩基以下の連続するrpoD遺伝子の塩基配列を用いて、プライマーを設計することができる。同様に近縁種と塩基が相違する位置を必ず含むように、当該近縁種と相違する塩基を含む連続する15塩基以上のrpoD遺伝子の塩基配列、好適には、20塩基以上、更に好適には、20塩基以上で、100塩

基以下の連続するrpoD遺伝子の塩基配列を用いて、プローブを設計することができる。

【0013】さらに、当該プライマー及びプローブの作製には、上記相違塩基を高頻度で含む領域、例えば、259, 261, 264, 267, 270を含む領域、141, 147, 148を含む領域、192, 198, 204を含む領域、223, 229, 234を含む領域、594, 597を含む領域が好適に使用できる。また、プライマーの場合3'末端が、腸炎ビブリオに特異的塩基であることが望ましい。本件発明は、これらプライマー及びプローブを、他の試薬と組み合わせた腸炎ビブリオの検出、定量又は同定用のキットを包含するものである。

【0014】

【表1】

表1. 使用した菌株

ビブリオ属 標準株	8株		
		<i>V. parahaemolyticus</i>	IFO 12711 T
		<i>V. alginolyticus</i>	IFO 15630 T
		<i>V. proteolyticus</i>	IFO 13287 T
		<i>V. nereis</i>	IFO 15637 T
		<i>V. campbellii</i>	IFO 15631 T
		<i>V. harveyi</i>	IFO 15634 T
		<i>V. carchariae</i>	IFO 15632 T
		<i>V. tubiashii</i>	IFO 15644 T
腸炎ビブリオ 保存株	13株	ヒト由来	V89-635 O3:K8 TRH:+
			V89-056 O4:K8 TDH:+
			V89-157 O1:K58 TDH:+
			V89-161 O4:K11 TDH:+
			V89-177 O4:K8 TDH:+
			V89-215 O3:K8 TDH:+
			V89-223 O4:K9 TDH:+
		食品由来	毒素非産生: 6株
TCBS分離株	64株	食品由来	
合計	85株		

【0015】

【実施例】〔実施例〕以下、本発明を実施例により詳細に説明する。実施例はその1様態であり、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。表2に示した腸炎ビブリオ検出・同定用プライマーを用いて、PCR法により腸炎ビブリオを特異的に検出する事を試みた。なお、請求項10~15に記載のプライマーは、それぞれ、F1, F2, F5, F6, R1, R2に当たる。試料として、前記表1に示した供試菌株から抽出した染色体DNAを鋳型として用いた。使用したプライマーの詳細を表2に示した。増幅反応は、耐熱性DNAポリメラーゼ (Ampli Taq Gold: Applied Biosystems製) を用い、GENE MATE サーマルサイクラー (ISC BioExpress) を使用して行った。反応液はDNA0.1 µg、50mM KCl、10 mM Tris-HCl pH 8.3、1.5 mM MgCl₂、0.01% ゼラチン、各0.2 mMのdNTP、2.5 U のAmpli Taq Gold、プライマー (濃度は表3

参照) を含む溶液を最終体積20 µlに調製した。反応条件は、Ampli Taq Gold の活性化 (95°C・10分間) に続いて、94°C・1分間、アニーリング (温度は表3参照) ・1分間、72°C・1分間の反応を35~40サイクル行った後に72°C・10分の伸長反応を行った。プライマーの組み合わせと増幅反応条件を表3に示した。増幅後の反応液5 µlを、2%アガロースゲル (アガロースS: (株) ニッポンジーン製) で電気泳動後 (0.5xTAE、100V・30分間)、臭化エチジウムで10分間染色し、紫外線照射下でrpoD遺伝子の増幅の有無を確認した。

【0016】センスプライマー4種類、アンチセンスプライマー2種類を用いて、計8通りのプライマーの組み合わせにより供試菌株のDNAをスクリーニングした結果、腸炎ビブリオと判定すべき系統に属するもののみが陽性となった (表4)。

【0017】

【表2】

表2. 腸炎ビブリオ特異検出用プライマー

プライマー	配列	長さ	位置 ^a	方向
F1	agarcttcgtctgactgatt	20	129 - 148	センス
F2	aagaagacctagaagatgat	20	251 - 270	センス
F5	cagcwgcgccaaccgcgact	20	185 - 204	センス
F6	ctgarctgtctgaarctcaa	20	215 - 234	センス
R1	gttaccagtgaatagggca	19	609 - 591	アンチセンス
R2	attcgttaccagtgaatagg	20	613 - 594	アンチセンス

^a: 配列番号1で表される塩基配列中での5'末端からの位置を示している。

【0018】

【表3】

表3. 腸炎ビブリオ特異検出用プライマーPCR条件

センスプライマー	アンチセンスプライマー	増幅産物 (bp)	PCR条件		
			アニーリング温度 (°C)	サイクル数	プライマー濃度 (μM)
F1	R1	483	58	35	0.1
F2	R1	361	56	40	0.1
F5	R1	427	64	40	0.1
F6	R1	397	60	35	0.1
F1	R2	485	58	40	0.1
F2	R2	365	60	40	0.5
F5	R2	431	60	40	0.1
F6	R2	401	56	40	0.1

【0019】

【表4】

[illegible]

34	C-2	<i>Vario</i> spp.	V44	—	—	—	—	—	—	—
35	C-2	<i>Vario</i> spp.	V41	—	—	—	—	—	—	—
36	C-2	<i>Vario</i> spp.	V89	—	—	—	—	—	—	—
37	C-2	<i>Vario</i> spp.	V87	—	—	—	—	—	—	—
38	C-2	<i>Vario</i> spp.	V78	—	—	—	—	—	—	—
39	C-2	<i>Vario</i> spp.	V88	—	—	—	—	—	—	—
40	C-2	<i>Vario</i> spp.	V4	—	—	—	—	—	—	—
41	C-2	<i>Vario</i> spp.	V86	—	—	—	—	—	—	—
42	C-2	<i>V. campbellii</i>	IFO 15631 T	—	—	—	—	—	—	—
43	C-2	<i>Vario</i> spp.	V18	—	—	—	—	—	—	—
44	C-1	<i>Vario</i> spp.	V88	—	—	—	—	—	—	—
45	C-1	<i>Vario</i> spp.	V85	—	—	—	—	—	—	—
46	C-1	<i>Vario</i> spp.	V16	—	—	—	—	—	—	—
47	C-1	<i>V. alginolyticus</i>	IFO 15630 T	—	—	—	—	—	—	—
48	C-3	<i>Vario</i> spp.	V70	—	—	—	—	—	—	—
49	C-3	<i>Vario</i> spp.	V71	—	—	—	—	—	—	—
50	C-5	<i>Vario</i> spp.	V77	—	—	—	—	—	—	—
51	C-5	<i>Vario</i> spp.	V82	—	—	—	—	—	—	—
52	C-4	<i>Vario</i> spp.	V45	—	—	—	—	—	—	—
53	C-4	<i>Vario</i> spp.	V8	—	—	—	—	—	—	—
54	C-4	<i>Vario</i> spp.	V10	—	—	—	—	—	—	—
55	C-4	<i>Vario</i> spp.	V13	—	—	—	—	—	—	—
56	C-4	<i>Vario</i> spp.	V8	—	—	—	—	—	—	—
57	C-4	<i>Vario</i> spp.	V9	—	—	—	—	—	—	—
58	C-4	<i>Vario</i> spp.	V7	—	—	—	—	—	—	—
59	C-4	<i>Vario</i> spp.	V14	—	—	—	—	—	—	—
60	C-4	<i>Vario</i> spp.	V11	—	—	—	—	—	—	—
61	C-4	<i>Vario</i> spp.	V12	—	—	—	—	—	—	—
62	C-4	<i>Vario</i> spp.	V79	—	—	—	—	—	—	—
63	C-4	<i>Vario</i> spp.	V43	—	—	—	—	—	—	—
64	C-4	<i>V. tubiashii</i>	IFO 15644 T	—	—	—	—	—	—	—
65	C-4	<i>V. nereis</i>	IFO 15637 T	—	—	—	—	—	—	—
66	C-4	<i>Vario</i> spp.	V64	—	—	—	—	—	—	—
67	C-4	<i>Vario</i> spp.	V98	—	—	—	—	—	—	—
68	C-4	<i>Vario</i> spp.	V55	—	—	—	—	—	—	—
69	C-4	<i>Vario</i> spp.	V57	—	—	—	—	—	—	—

SEQUENCE LISTING

```
<:110>: Nichirei  
<:120>: Identification of V.parahaemolyticus  
<:130>: P00-960  
<:140>:  
<:141>:  
<:160>: 8  
<:170>: PatentIn Ver. 2.1  
<:210>: 1
```

<:211>: 807

<:212>: DNA

<:213>: v. parahaemolyticus

<:400>: 1

actcgcrag gcgaaatcga catcgcaaaa cgcattgaag aaggatttaa ccaagttcaa 60
 tcgtctgttg ctgaataccc tggcactatt cottacatcc tagagcaatt tgataargtt 120
 caggcagaag arcttcgtct gactgattta atctctggct ttgtagatcc tgacgctgac 180
 gatacagcwg cgccaaccgc gactcacatc ggttctgarc tgtctgaarc tcaattagaa 240
 gaggaagacg aagaagacct agaagatgat gaagaragcg atgacgattc agatgaytcr 300
 gaagaagatg taggtattga yccagagctr gcgcttgaga aattcaacca gctacgcagc 360
 acataccaaa atcttcagct agcgatcaat gactacggct acgacagccc gaaagcaacc 420
 gttgctaacg aatgatgct rgacgtattc aaagaattcc gtctaaccac aaaacagttc 480
 gaccacctag tgaacgaact tcgyacwgca atggatcgcg ttctgtactca agaacgtttg 540
 atcatgaagt ctgtggttga atacggcaaa atgccgaaga aatcgtyat tgccttattc 600
 actggttaacg aatcaagtga tgcattggcta gacgagatcc tmgcatctga caagccatac 660
 gctgagaaaa tcaaacgtaa cgaagaagag atccgtcgtt caatckckaa gttaaaaatg 720
 attgaagaag agacatmtct aaacgtacar aacattaaag acatcagccg tcgcatgtct 780
 atcgggtgaag cgaaagcacg ccgtgcg 807

<:210>: 2

<:211>: 807

<:212>: DNA

<:213>: Artificial Sequence

<:220>:

<:223>: Description of Artificial Sequence:consesus

sequence among Vibrio spp. other than Vibrio
 haemolyticus

<:400>: 2

actcgcrag gcgaaatcga catcgcaaaa cgtattgaag aaggatttaa ccaagttcaa 60
 tcgtctgttg ctgaataccc wgyacdaty ccrtacatyc ttgagcartt tgayaargtw 120
 caagcwgaag aaytdcgtct wacwgacwtw atytcwgght ttgthgaycc wgaygchgay 180
 gayacvrcwg chccracrgc racrcacaty ggttctgarc tractgaatc tcagytagaa 240
 gawgaagayg awgaagacgt tgatgamgac gaagawrgyg aygayrrykm wgatgahdcw 300
 gargaagatg twggtatyga yccwgarytd gcgctwgaga aattcaacca rctacgcagy 360
 acvtaycaaa aycttcaryt wgcaatcaac garyacggyt ayravagycc kaaagcracm 420
 gtwgcaayg arwtgatgct agacgtatty mrmgarttyc gtctracrc waaacagttt 480
 gaycacatag traaygaayt rcgyacnkcd atggatcggy ttctgtacwca agarcgyytg 540
 atcatgaark cwryngttga atacggcaaa atgccgaaga aatcrttyat ygcrtgtty 600
 acwggyaayg aatcwashga wgcwtggytr gatgarrrty twkcwtcwg yaagccatac 660
 gctgaraara tyaaacgtar cgaagaagar atycgycgyt caatcrctaa rctaaaratg 720
 attgarrahg aracytmtct rammgtwcar aacatyaaag acatcagccg tcgyatgtmt 780
 atcgggtgaag craaagmkcg ycggtgck 807

<:210>: 3

<:211>: 20

<:212>: DNA

<:213>: v. parahaemolyticus

<:400>: 3

agarcttctg ctgactgatt 20

<:210>: 4

<:211>: 20

<:212>: DNA

```

<:213>: v. parahaemolyticus
<:400>: 4
aagaagacct agaagatgat 20
<:210>: 5
<:211>: 20
<:212>: DNA
<:213>: v. parahaemolyticus
<:400>: 5
cagcwgcgcc aaccgcgact 20
<:210>: 6
<:211>: 20
<:212>: DNA
<:213>: v. parahaemolyticus
<:400>: 6
ctgarctgtc tgaarctcaa 20
<:210>: 7
<:211>: 19
<:212>: DNA
<:213>: v. parahaemolyticus
<:400>: 7
gttaccagtg aataggcca 19
<:210>: 8
<:211>: 20
<:212>: DNA
<:213>: v. parahaemolyticus
<:400>: 8
attcgttacc agtgaatagg 20

```

【図面の簡単な説明】

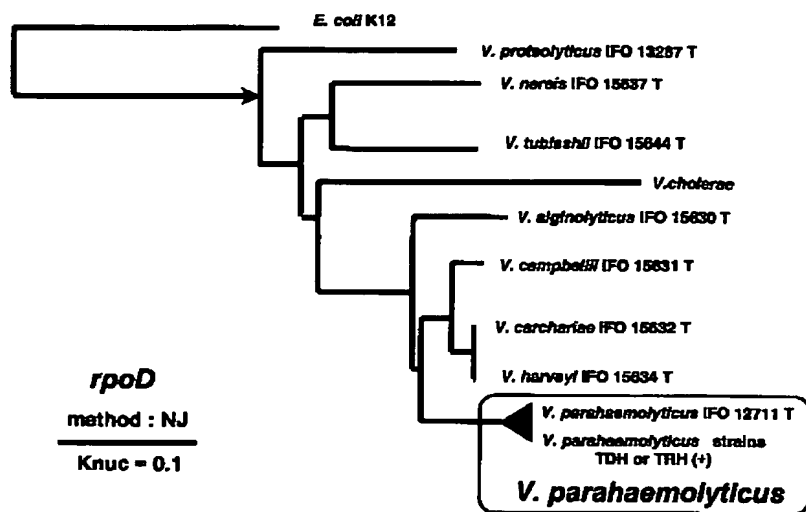
【図 1】 腸炎ビブリオと他のビブリオ属近縁菌種との rpoD 遺伝子に基づいた分子系統図

【図 2】 食品由来腸炎ビブリオ様コロニーの rpoD 遺伝子

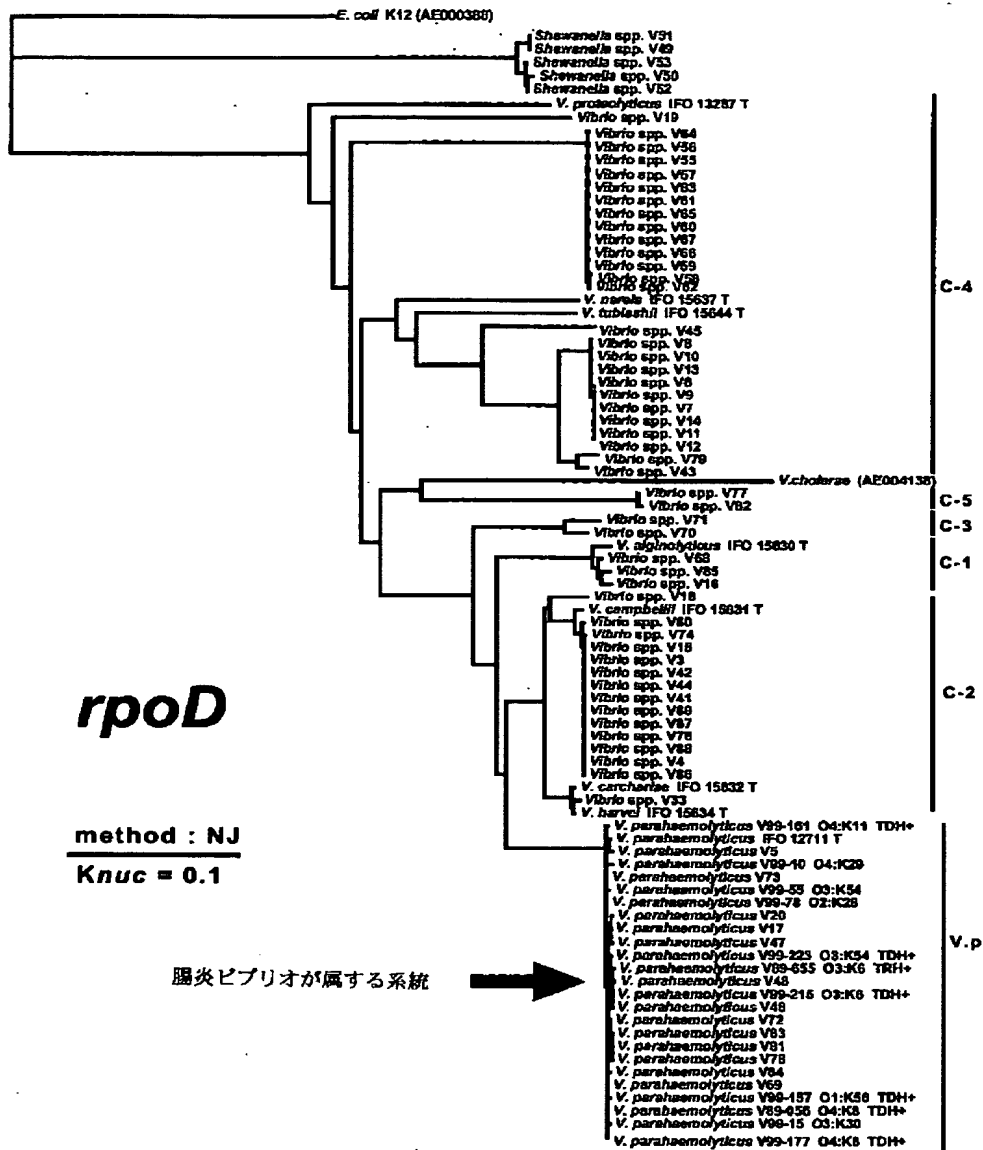
に基づいた分子系統図

【図 3】 ビブリオ属における rpoD 遺伝子塩基配列間特異性情報図

【図 1】

図1. *rpoD*遺伝子配列に基づいたビブリオ属の分子系統樹

【図2】

図2. 食品由来腸炎ビブリオ様コロニーの *rpoD*遺伝子に基づいた分子系統解析

PCRダイレクトシーケンス法により決定した約 800bp の *rpoD* 遺伝子部分配列を解析し、近隣結合法(NJ)にて作成した分子系統樹。生化学的性状(食品衛生検査指針に準じ、2次確認検査まで実施)の解析により腸炎ビブリオと判定された株は *V. parahaemolyticus* と配した。腸炎ビブリオが属する系統をV. p. それ以外のビブリオ属の系統を図中に示した通りC1~5に分類した。*E. coli* K12 株および *V. cholerae* の *rpoD* 遺伝子配列は、それぞれGenBankデータベースのアクセッションナンバー AE000380ならびに AF004138を用いた。

Sequence	Position	Consensus
V.p.-ConsensusSeq	1	ACTCGCTAAGCGGAAATCGACATCGCAAAACGCATTGAAGAGAGGTATTAACCAAGTTCAA
C123-ConsensusSeq	1G.....T.....
V.p.-ConsensusSeq	61	TCGCTCTGTCGTAAGAACCTGGCAGTATTCCTTACATCTAGACCAATTTGATAAGGT
C123-ConsensusSeq	61V..Y..D..Y..R.....Y..T.....R.....Y.....V
V.p.-ConsensusSeq	121	CAGCGACAGAACCTCTCGCTGCTACGATTTAAATCTCTGGCTTTGTACATCTCTGACCGCTGAC
C123-ConsensusSeq	121	..A..W.....AY..D.....T..W..U..CC..Y..W..H.....H..Y..W..Y..H..Y
V.p.-ConsensusSeq	181	GATACAGCGCGCCCAACCGGAGCTCACATCGGTTCGATCTGTCTGAABCTCAATTAGAA
C123-ConsensusSeq	181	..Y..VR.....H..R..R..R..R.....T.....TA.....T.....CY.....
V.p.-ConsensusSeq	241	GAGCAACACCAAGCAAGCATCTAGAGATCATGARGARAGCGATGACGATTCTGATGATTCR
C123-ConsensusSeq	241	..W.....Y..W.....G..T..T..M..C.....WR..Y..Y..YENYEN.....HD..V
V.p.-ConsensusSeq	301	GAAGAAGATGTAGGTATTGATCCAGAGCTGCGCTTGAGAAATTCACCAACGCTACCGACG
C123-ConsensusSeq	301	..R.....W.....Y.....W.....HY..D.....W.....R.....Y
V.p.-ConsensusSeq	361	ACATACCAAAATCTTCAGCTAGCGATCAATGACGCTACGACAGCCCGAAGCAAC
C123-ConsensusSeq	361	..V..Y.....Y.....BY..W..A.....C..RY.....Y..YR..V..Y..E.....R..H
V.p.-ConsensusSeq	421	GTTCGTAAACGAAATCATGCTGTGACGATTTCAAGGAATTCGGCTCAACACCAABACAGTTC
C123-ConsensusSeq	421	..W..W..Y..W.....YHNM..R..Y.....R..R..W.....Y
V.p.-ConsensusSeq	481	GACCACTAGTGAACGAATCTCGYACGCGCAATGGAATCGGCTCGTACTCAAGACGCTTTC
C123-ConsensusSeq	481	..Y..Y.....R..Y..Y..B.....HE..D.....Y.....W.....R..Y..Y
V.p.-ConsensusSeq	541	ATCATGAAGCTCTCGCTGGAATACCGGCAAAATGCCGAAGGAATCTGTTATTCGCTTATTC
C123-ConsensusSeq	541RR..WHTY.....R.....Y..R..G..Y
V.p.-ConsensusSeq	601	ACTGCTAACGAATCAAGTGATGATCTGCTAGACGAGATCCTTGATCTCTGACAGCCATAC
C123-ConsensusSeq	601	..W..Y..Y.....W..SH..W..W..Y..E..T..RR..Y..W..W..W..Y.....
V.p.-ConsensusSeq	661	GCTGAGAAATCAAAACCTAACCAAGAAGAGATCCGTCGTTCAATCEKAAATTTAAAGATG
C123-ConsensusSeq	661R..R..Y.....R.....R..Y..Y..Y.....R..T..RC.....R.....
V.p.-ConsensusSeq	721	ATTGACAGACAGACATCTCTTAACGTCACAAACATTTAAGACATCAGCCGTCGCATCTCT
C123-ConsensusSeq	721HM..H..K..Y.....R..HM..W.....Y.....Y.....W.....
V.p.-ConsensusSeq	781	ATCGGTGAAGCGAAAGCGCCCGCTGCG
C123-ConsensusSeq	781R.....R.....H.....Y.....K

図1中に示したV.p.及びC-1~3の系統のコンセンサス配列を決定し相同性を解析した結果。上段がV.p.(腸炎ブドウ球菌)が属する系統)下段がC-1~3系統のコンセンサス配列。●で示した部分は上の配列に対して同じ配列であることを示す。●で示した部位が腸炎ブドウ球菌に特異的な塩基であることを表している。D=A又はG又はT、H=A又はC又はT、V=A又はC又はG、R=A又はG、Y=C又はT、K=G又はT、M=A又はC、G=A又はC、W=A又はT、N=A又はG又はT又はCを示す。

東京都中央区日本橋箱崎町44-1 財団法人東京顕微鏡院 日本橋研究所内

Fターム(参考) 4B024 AA13 BA80 CA09 HA12
4B063 QA19 QQ06 QQ42 QR08 QR32
QR42 QR55 QR62 QS25 QS34
QX01